

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：38001

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06101

研究課題名(和文) 土壌生物多様性モニタリング技術の抜本的改善： 過大・過小評価の抑制と定量性の向上

研究課題名(英文) Struggle with over- and underestimation of soil biodiversity in metabarcoding technology

研究代表者

齋藤 星耕 (Seikoh, Saitoh)

沖縄国際大学・経済学部・准教授

研究者番号：10623754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：トビムシ類 1個体からの全ゲノムショットガン法(WGS)用の「ライブラリ調整プロトコル」を確立した。このプロトコルにより、3種5個体のミトゲノム配列が決定された。すでに公開されている31配列と併せて分析したところ、16S RNA 遺伝子上に、トビムシ類で広く保存されている領域を同定することが出来た。この領域は、以前に Saitoh et al. (2016, Genome) で発表されたメタバーコーディング用PCRプライマーの一組と同じ領域であったが、一部の分類群では配列のミスマッチがあったことが明らかとなった。これに対応し、増幅の偏りを改善する縮重プライマーを設計することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は高速並列DNAシーケンサー(NGS)による生物群集調査手法、特にその土壌動物における技術的改善を企図し、種によらず偏りなく増幅できるPCRプライマーを設計した。今後これを用いた群集調査を実施し、有効性を引き続き検証する。

本研究の派生的な成果として、土壌の微小な動物 1個体からの全ゲノムショットガン法の確立が挙げられる。NGSによる群集調査においてデータベースの蓄積が重要であるが、本手法では、容易にミトコンドリアゲノム全長配列が得られ、対象遺伝子が異なる複数のマーカーのために一度にデータベース蓄積が行える。また、トビムシ類の系統進化の解明にも貢献できる。

研究成果の概要(英文)：We established a laboratory protocol for sequencing mitochondrial genomes from individual Collembola specimens via whole-genome shotgun (WGS) sequencing. Contigs derived from WGS data provide sequencing depth information, reflecting their abundance in the total DNA. Consequently, it becomes possible to distinguish mitochondrial sequences from pseudogenes present in the nuclear genome.

We analyzed 5 newly sequenced mitogenomes in combination with 31 previously published mitogenomes. This analysis led to the identification of two conserved regions within the 16S ribosomal RNA gene. These regions matched the previously published metabarcoding primers described by Saitoh et al. (2016, Genome). Upon aligning the sequences, we observed primer sequence mismatches in certain taxa. These mismatches may explain the previously observed low PCR amplification of these taxa. To improve the metabarcoding method, we suggest utilizing degenerate PCR primers designed based on the consensus sequences.

研究分野：土壌動物学

キーワード：トビムシ ミトゲノム メタバーコーディング

1. 研究開始当初の背景

生物の種同定技術としての DNA バーコーディングは、生物標本から遺伝マーカーとして比較的短い塩基配列を解読し、データベースを参照して種を決定するものである (Hebert et al. 2003 *Proc. R. Soc. Lond. B*)。メタバーコーディングは、これを高速並列シーケンサー (いわゆる次世代シーケンサー、NGS) を用い、未ソートの集合標本や、水や土壌などの環境試料に適用し、生物群集調査に利用する手法である (Taberlet et al. 2018 *Oxford Univ. Press*)。

メタバーコーディング用の DNA ライブラリは、遺伝マーカーを PCR 増幅することで調整される。この PCR の段階において、生物的要因 (鋳型となる DNA の個体あたりに含まれるコピー数、DNA 抽出効率の種間差) と PCR バイアス (PCR プライマーのアニーリングサイトにおける塩基配列のミスマッチの程度、マーカー領域の GC 率における種間差による増幅効率の種間差) が作用することにより、種ごとの試料中の存在頻度と、DNA ライブラリ中の存在頻度は異なったものとなる (Deagle et al. 2014 *Biol. Lett.*)。このため、メタバーコーディングは、種の在・不在を評価することは可能であるが、個体数やバイオマスを推定することには適さないとみなされてきた (例えば Yu et al. 2012. *Methods Ecol. Evol.*)。

土壌動物のメタバーコーディングにおいても同様の状況 (Ramirez-Gonzalez et al. 2013 *PLoS ONE*) であったが、研究代表者らは、同一のライブラリ調整プロトコルの下で、内部標準となる種を基準として標準化すれば、リード数には半定量性がある (個別の種について試料間でどちらが多いかは分かる) ことを示した (Saitoh et al. 2016 *Genome*)。

一方で、このデータは、個体あたりに得られるリード数は、種によって大きく異なっており、その大きな原因は PCR であることが示唆された。また、メタバーコーディング用マーカーを用いて個別の標本から得られた PCR 産物を NGS で解析してみたところ、一つの標本から複数の種類の配列が出現することが珍しくないことが分かり、偽遺伝子、特に核ゲノム内に挿入された過去のミトコンドリアゲノム配列 (Nuclear mitochondrial DNA) から増幅されている可能性が考えられた。

これらの状況から、

1. PCR で増幅されない種は存在しなかったことになる問題 (生物多様性の過小評価)
 2. PCR で偽遺伝子が増幅されることで新種や種内の遺伝的多様性と誤認される可能性がある問題 (生物多様性の過大評価)
 3. 定量性の向上
- という3つの点がメタバーコーディングで解決すべき課題として認識された。

2. 研究の目的

当初、前記の各課題にそれぞれ取り組む戦略を設定していたが、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の感染拡大を受け、標本の収集、機材の借用に困難が生じ、見直しを迫られることになった。このため、1および3の課題に軸足を置いて、その改善を目指すこととした。

この目的のため、トビムシ類を対象として、

- a. トビムシ類の種による偏りなく増幅することが出来る PCR プライマーの設計
 - b. トビムシ類の同定用データベース構築
- を目標として再設定した。

3. 研究の方法

a. トビムシ類の種による偏りなく増幅することが出来る PCR プライマーの設計

メタバーコーディング用プライマーの設計にはミトコンドリアゲノム全長配列を用いた。研究代表者らが公表した以前のプライマー (Saitoh et al. 2016 *Genome*) では、トビムシ類においてその時点でデータベース Genbank から利用可能な 10 配列を利用していた。本研究では代表者らにより自ら解読を行い、現在データベースから利用可能な配列と併せてプライマーの再設計を行った。

集団内の多様性の高さを考慮して、複数個体の DNA をプールすることは避け、トビムシ類 1 個体からの全ゲノムショットガン法を実施した。ライブラリ調整においては、少ない DNA 量に応じて試薬を希釈し、予備実験により適切な断片化が行える反応時間を決定した。また、きわめて小型で単為生殖の種については、1 個体から増殖させた飼育個体群を試料に用いた。Illumina 社の NGS を用いて解析した配列データをアセンブルしてミトコンドリアゲノム全長配列を得た。

得られた 3 種 5 個体のミトコンドリアゲノム配列 (後述) と、データベースからダウンロードした 33 のミトコンドリアゲノム配列をアラインメントし、トビムシ類で種によらず保存されている領域を探索した。

b. トビムシ類の同定用データベース構築

南西諸島を中心に、トビムシ類の標本を収集し、16S リボソーマル RNA (16S rRNA) 遺伝子 シトクローム C オキシダーゼサブユニット I (COI) 遺伝子の配列をサンガー法により解読し、データベースの蓄積を行った。

4. 研究成果

a. トビムシ類の種による偏りなく増幅することが出来る PCR プライマーの設計

3 科 3 種から 5 個体のミトコンドリアゲノム配列を解読することが出来た (表 1)。トゲトビムシに類似する種 (*Tomocerus* cf. *ocreatus*) の 2 地域個体群から、それぞれ 1 つのミトゲノムを解読できた。またアカイボトビムシの一種 *Lobella* sp. について 2 個体のミトゲノムを解読した。さらに、微小な体サイズのために 1 個体からの解読が困難であったヨシイホソシロトビムシ *Mesaphorura yosii* では、単為生殖のため、1 個体から増やした飼育個体群を試料とすることで解読することが出来た。

表 1. 解読したミトコンドリアゲノム (学会発表[4]より)

Lib	サンプル	データ量	リード数	平均挿入長	ミトゲノム		
					比率	解読深度	配列長
ST_1_S74	<i>Mesaphorura yosii</i> 飼育個体群	6.7 GB	21 M	218 bp	0.11%	382x	14,982 bp
ST_A_S88	<i>Lobella</i> sp. 個体A	2.7 GB	8 M	303 bp	0.24%	286x	18,205 bp
ST_C_S87	<i>Lobella</i> sp. 個体C	4.0 GB	12 M	285 bp	0.22%	386x	16,041 bp
ST_oki1_S86	<i>Tomocerus</i> sp. 個体78A (沖縄島北部)	1.6 GB	4 M	387 bp	0.12%	104x	14,847 bp
ST_oki2_S85	<i>Tomocerus</i> sp. 個体79B (沖縄島南部)	3.2 GB	9 M	353 bp	0.13%	232x	14,797 bp

これらのミトゲノムの塩基配列と、GenBank Refseq データベースに収録されている 31 のトビムシ類のミトゲノム配列を併せてアラインメントし、トビムシ類で広く保存されている領域を同定した (図 1)。

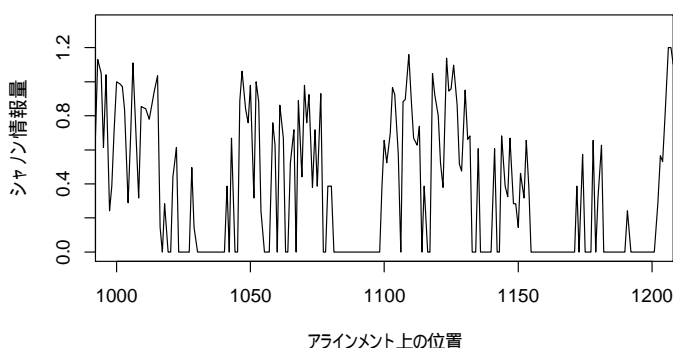


図 1. ミトゲノム配列上の保存されている領域の同定 (16S rRNA 遺伝子の例)。シャノン情報量が小さいほど、配列が保存されていることを示す。

COI 遺伝子をはじめとして、タンパク質をコードしている領域では塩基配列の同義置換により、3 塩基ごとに塩基の多様性が高い座位が続き、これに対応する縮重プライマーは複数の多義字を含まざるを得ず、通常こうした PCR プライマーは増幅効率や特異性の点で劣ることから、メタバーコーディングの対照領域としては向いていないと考えられた。

一方で、16S rRNA 遺伝子では、保存性の高い領域が複数同定され、その中で、一定以上のアニーリング部位の配列の長さが取れる領域は、研究代表者らが公表した以前のプライマーのアニーリング部位 (Saitoh et al. 2016 *Genome*) と同一であった。しかしながら、この部位のコンセンサス配列は、Forward プライマー側で 1 カ所、Reverse プライマー側で 2 カ所の多義文字 (ambiguous base) を含み、メタバーコーディングではこれに対応した縮重プライマーとする (3'側に近い各 1 カ所に対応する多義文字を入れる) ことで、より種によって偏りの少ない PCR 増幅が可能となると考えられた (学会発表[4])。

本研究の派生的な成果として、南西諸島の伝統的作物であるタイモ (タロイモ/サトイモ *Colocasia esculenta* の一地域品種) の色素体の全長配列を得ることが出来た。標準的な植物の DNA バーコード (リブロース-1, 5-ニリン酸カルボキシラーゼ・オキシゲナーゼ大サブユニット (*rbcL*) 遺伝子、マチュラーゼ (*matK*) 遺伝子) では、タロイモの品種間を区別できる情報量がないが、色素体の全長配列を検討することにより、中国大陸のある品種と近縁であることが示された (論文[1], 学会発表[1])。

b. トビムシ類の同定用データベース構築

トビムシ類を中心に、215 個体の DNA バーコード配列を解析した。

なお、派生的な成果として、トゲトビムシに類似する種 (*Tomocerus* cf. *ocreatus*) について、南西諸島における遺伝的多様性の評価、東アジアの近縁種との進化系統樹の推定を行い、地域集団の成立と、地史的イベント (琉球弧の成立) との関係を議論した (論文[2], 学会発表[3,5])。また、DNA バーコードによる分子的種同定に基づいて、トンボ目近縁 2 種の幼虫における形態的特徴の違い及び識別点を議論した (学会発表[2])。

論文：

- [1] 上原勇太, 上原佳乃子, 齋藤星耕 (2022) タイモの DNA バーコーディング. 経済環境研究, 11: 61-76.
- [2] 高江洌鈴奈, 齋藤星耕 (2022) 奄美大島で採集されたトゲトビムシに類似した種 *Tomocerus* cf. *ocreatus* (Collembola: Tomoceridae) とその DNA バーコードについて. 沖縄国際大学南島文化研究所地域研究シリーズ, 47: 37-46.

学会発表：

- [1] 高江洌鈴奈, 金城嵐太, 齋藤星耕. タイモの起源を探る. 沖縄生物学会第 59 回大会, 発表番号 A-02 (2022 年 5 月, オンライン).
- [2] 金城嵐太, 高江洌鈴奈, 齋藤星耕. オオシオカラトンボ *Orthetrum melania* (Selys, 1883), 及びハラボソトンボ *Orthetrum sabina* (Drury, 1770) 若齢幼虫の形態的種同定. 沖縄生物学会第 59 回大会, 発表番号 B-13 (2022 年 5 月, オンライン).
- [3] 高江洌鈴奈, 齋藤星耕. 南西諸島のトビムシ類の DNA バーコーディング - トゲトビムシ科 Tomoceridae を中心に. 日本土壤動物学会第 44 回大会, 発表番号 P-07 (2022 年 6 月, 静岡).
- [4] 高江洌鈴奈, 金城幸宏, 中森泰三, 齋藤星耕. トビムシ類 1 個体からのミトゲノム解読: メタバーコーディング用 PCR プライマーの改善に向けて. 日本土壤動物学会第 45 回大会, 発表番号 O-7 (2023 年 6 月長野).
- [5] 高江洌鈴奈, 金城幸宏, 齋藤星耕. 琉球弧で採集されたトゲトビムシに類似する種 *Tomocerus* cf. *ocreatus* の分子系統解析. 日本土壤動物学会第 45 回大会, 発表番号 O-8 (2023 年 6 月長野).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 上原勇太, 上原佳乃子, 齋藤星耕	4. 巻 11
2. 論文標題 タイモのDNAバーコーディング	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 経済環境研究	6. 最初と最後の頁 61-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 高江洌鈴奈, 齋藤星耕	4. 巻 47
2. 論文標題 奄美大島で採集されたトゲトビムシに類似した種 <i>Tomocerus</i> cf. <i>ocreatus</i> (Collembola: Tomoceridae) とそのDNAバーコードについて	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 沖縄国際大学南島文化研究所地域研究シリーズ	6. 最初と最後の頁 37-46
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤星耕
2. 発表標題 四十にして惑う (研究奨励賞受賞講演)
3. 学会等名 日本土壤動物学会第43回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高江洌鈴奈, 金城嵐太, 齋藤星耕
2. 発表標題 タイモの起源を探る
3. 学会等名 沖縄生物学会第59回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 金城嵐太, 高江洌鈴奈, 齋藤星耕
2. 発表標題 オオシオカラトンボ <i>Orthetrum melania</i> (Selys, 1883), 及びハラボソトンボ <i>Orthetrum sabina</i> (Drury, 1770) 若齡幼虫の形態的種同定
3. 学会等名 沖縄生物学会第59回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高江洌鈴奈, 齋藤星耕
2. 発表標題 南西諸島のトビムシ類の DNA バーコーディング トゲトビムシ科 Tomoceridae を中心に
3. 学会等名 日本土壤動物学会第44回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高江洌鈴奈, 金城幸宏, 中森泰三, 齋藤星耕
2. 発表標題 トビムシ類 1 個体からのミトゲノム解読: メタバーコーディング用 PCR プライマーの改善に向けて
3. 学会等名 日本土壤動物学会第45回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高江洌鈴奈, 金城幸宏, 齋藤星耕
2. 発表標題 琉球弧で採集されたトゲトビムシに類似する種 <i>Tomocerus</i> cf. <i>ocreatus</i> の分子系統解析
3. 学会等名 日本土壤動物学会第45回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------